Contribution à l'étude de la fertilité chez *Pagellus erythrinus* : spermogramme et spermocytogramme

par

Shahnaz LECHEKHAB (1)

RÉSUMÉ. - L'analyse d'échantillons mensuels de sperme de *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758) au cours de la période de reproduction, entre mars et septembre, dans le golfe d'Annaba, révèle une augmentation graduelle de la densité des spermatozoïdes durant la phase du développement et de maturation sexuelle, de mars à mai, où l'on note une moyenne de $36,12.10^9$ cellules/ml en juin, le plus haut taux de spermatozoïdes coïncidant avec le début de la phase de ponte. À partir d'août, la densité des spermatozoïdes baisse pour atteindre une moyenne de $4,80.10^9$/ml, témoignant de la phase de post-ponte. La mobilité et la vitalité des spermatozoïdes, faibles au début, sont maximales durant la période d'émission, de mai à juillet et deviennent minimales à la fin de la saison de spermiation. Au milieu de la période de spermiation, la mobilité et la qualité de mouvement des spermatozoïdes, observées toutes les cinq minutes, se modifient graduellement et tendent à baisser à partir de la 15e minute. Les spermatozoïdes dont le mouvement était progressif et rectiligne, deviennent désorientés et aléatoires puis mobiles non progressifs et s'immobilisent à partir de 60 minutes. Le spermocytogramme nous a permis de mettre en évidence quelques formes morphologiques atypiques de spermatozoïdes qui reflètent leur faible pouvoir fécondant. Sur 600 observations nous avons relevé 32% de spermatozoïdes présentant des anomalies cytologiques.

ABSTRACT. - Contribution to the study of the fertility in *Pagellus erythrinus*: Spermogramme and spermocytogramme.

The monthly sampling analysis of the sperm of *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758) during the period of reproduction reveals a gradual increase of the density of spermatozoa during the development phase and sexual maturing, from March to May. We note an average of 36.12 x 10^9 cells/ml, the highest rate of sperm cell coinciding with the beginning of the spawning phase. From August the density of spermatozoa falls to reach an average of 4.80 x 10^9 cells/ml, giving evidence of the postspawning phase. Mobility and vitality of spermatozoa are maximal during the period of emission from May to July and become minimal in the end of the season of spermiation. In the middle of the spermiation period, mobility and quality of movement spermatozoa of observed every 5 minutes is gradually modified and tends to fall from the 15th minute. The spermatozoa movement passes from rectilinear to disorientated, then mobile but not progressive, and stand from 60 minutes onwards. The spermocytogramme has allowed us to put in evidence some morphological abnormalities of the spermatozoa, which influence their fertilizing power. Out of 600 observations we found 32% of spermatozoa presenting abnormalities.

Key words. - *Pagellus erythrinus* - Male fertility - Sperm - Spermatozoa - Spermogramme - Spermocytogramme.

L'étude des différents aspects de la biologie de la reproduction des téléostéens est en plein progrès (Stockley *et al.*, 1996). On a montré que la quantité de sperme éjaculée dans les conditions naturelles du frai est suffisante pour la fécondation et le développement d'environ 99% des œufs (Mellinger, 2002). La fertilité masculine dépend du nombre et de la qualité des spermatozoïdes émis par le poisson et leur capacité de fécondité. Le spermocytogramme permet de mettre en évidence certaines anomalies cytologiques du spermatozoïde qui peuvent être directement responsables de son infertilité (Mellinger, 2002), vu que les parties anatomiques mal formées (la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle) deviennent peu ou non fonctionnels et influencent le pouvoir fécondant du spermatozoïde.

Le spermogramme consiste en l'exploration et l'analyse physique du sperme par lesquelles on établit la densité des spermatozoïdes, leur mobilité et leur vitalité et on recherche des agglutinations spermiques.

Pour évaluer le pouvoir fécondant du sperme, on mesure l'activité locomotrice des spermatozoïdes sur un échantillon de sperme, ce qui indique la mobilité spermique. On peut la définir sans tenir compte de la vitesse de déplacement, en ne mesurant que la durée de persistance des mouvements spermatiques après dilution du sperme dans un milieu adéquat et dans des conditions de température convenables (Suquet *et al.*, 1994).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillonnage de la laitance

Le sperme est récolté sur des poissons en période de frai avant ou en cours d'émission. L'échantillonnage du sperme est effectué dans des conditions aseptiques à l'aide d'une pipette placée au bord de l'orifice urogénital et l'écoulement de la laitance est obtenu par une pression sur les flancs de

(1) Département des sciences de la mer, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar, BP 15 El Hadjar, Annaba 23000, ALGÉRIE. [lechekhabshahnaz@yahoo.fr]

cent vingt poissons *Pagellus erythrinus* mesurant de 250 à 319 mm de long au cours de la période de reproduction, de mars à septembre (Lechekhab, 2006), dans le golfe d'Annaba (Nord-Est algérien).

Spermogramme

Examen physique du sperme

Le sperme conservé dans des tubes hermétiques est immédiatement examiné en relevant ses caractéristiques physiques : odeur, couleur et viscosité.

La viscosité est appréciée d'une façon approximative par le retrait d'une pipette plongée dans le sperme. Elle est élevée lorsque le sperme forme un long fil. La viscosité est dite faible lorsque le sperme forme une goutte au bout de la pipette.

Numération des spermatozoïdes

Le sperme (0,1 ml) est dilué au $1/100^e$ dans le formol de Ringer. Une goutte du mélange homogénéisé déposée sur une lame à numération de Mallassez est observée au microscope (Gr. x 400). Après 10 min, temps nécessaire pour l'immobilisation des spermatozoïdes, leur comptage est répété trois fois et une moyenne est calculée.

Mobilité des spermatozoïdes

Le sperme (0,1 ml) est dilué au $1/100^e$ dans une eau de mer à 20‰. Cette salinité permet une meilleure motilité des spermatozoïdes (Billard, 1984). Une goutte de ce mélange est observée entre lame et lamelle.

La durée et l'intensité de la mobilité sont immédiatement déterminées après dilution à intervalle de 5 min jusqu'à l'immobilisation totale des spermatozoïdes. Cette mobilité est estimée selon l'échelle de Billard (1984), en 5 indices d'intensité : 5 : fortement progressive et rapide ; 4 : progressive moins rapide ; 3 : désorientée et aléatoire ; 2 : lente ou faiblement progressive ; 1 : mobile mais non progressive ; 0 : immobilité.

L'aspect de la mobilité est aussi apprécié, dans nos observations, en fonction du mouvement des spermatozoïdes variant d'un mouvement actif rectiligne à peu actif ou immobile en passant par des mouvements désordonnés, aléatoires faiblement progressifs.

Spermocytogramme

Une goutte de sperme diluée dans du formol de Ringer, est étalée sur une lame. Ce frottis immédiatement fixé au moyen du spray de fixation est directement coloré par la méthode de Papanicolaou (Chevreau *et al.*, 1977).

L'observation des frottis colorés (Gr. x 1000) nous permet de mettre en évidence, selon leur aspect morphologique, des spermatozoïdes normaux et d'autres anormaux, de formes atypiques.

RÉSULTATS

Le sperme de *Pagellus erythrinus* est blanc, inodore, visqueux. La viscosité est élevée durant toute la période de spermiation d'avril à juillet (Lechekhab, 2006). La densité des spermatozoïdes augmente graduellement au cours de la période de reproduction. Au début de la spermiation, en avril, la densité des spermatozoïdes est minimale d'une moyenne de $8{,}36.10^9$/ml ; elle est de $12{,}22.10^9$/ml en mai et atteint ses valeurs maximales en juin avec $36{,}12.10^9$/ml puis diminue graduellement jusqu'à $20{,}33.10^9$/ml en juillet pour atteindre de nouveau des valeurs faibles en août de $4{,}80.10^9$/ml (Fig. 1), témoignant de la fin de la période d'émission durant laquelle les gonades entament une phase de postponte ou de récupération. La vitalité des spermatozoïdes est à son apogée au cours de l'émission, de mai à la fin de juillet où les spermatozoïdes sont plus rapides, bien progressifs avec un trajet rectiligne. L'intensité de la mobilité des spermatozoïdes est alors maximale en période de spermiation, affichant un indice de 5 en juin, elle est cependant faible au début et à la fin de cette période avec un indice de 3 en avril et de 4 en août.

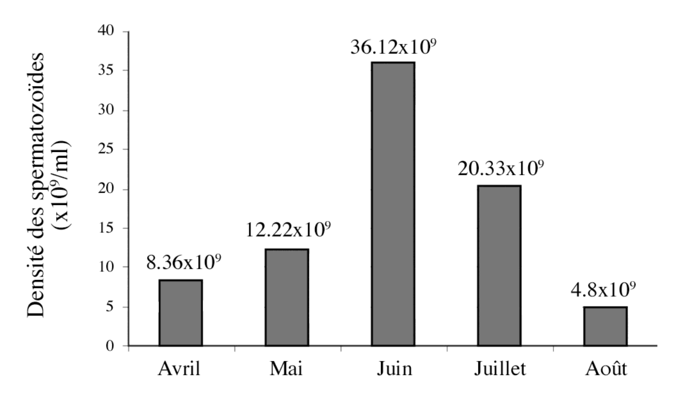


Figure 1. - Densité des spermatozoïdes chez *Pagellus erythrinus*. *[Density of spermatozoa of* Pagellus erythrinus.*]*

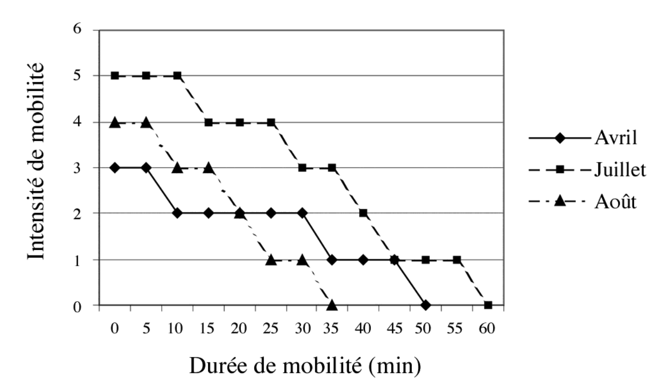


Figure 2. - Durée et intensité de mobilité des spermatozoïdes chez *Pagellus erythrinus*. *[Duration and intensity of mobility of spermatozoa of* Pagellus erythrinus.*]*

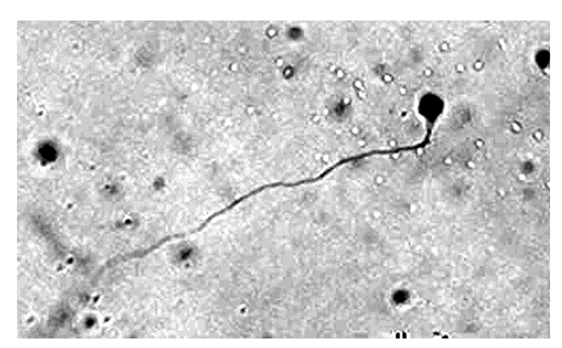


Figure 3. - Aspect morphologique de spermatozoïde chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Morphological aspect of spermatozoa . Papanicolaou staining.]*

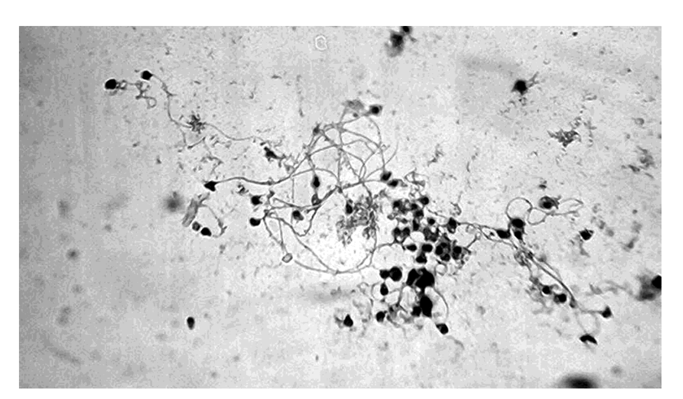


Figure 4. - Agglutination des spermatozoïdes chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Agglutination of spermatozoa. Papanicolaou staining.]*

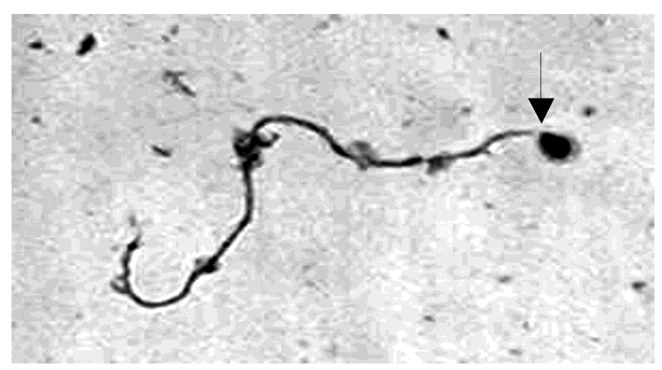


Figure 5. - Anomalie de la pièce intermédiaire du spermatozoïde : non visible chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the intermediate piece of spermatozoa: not visible staining. Papanicolaou staining.]*

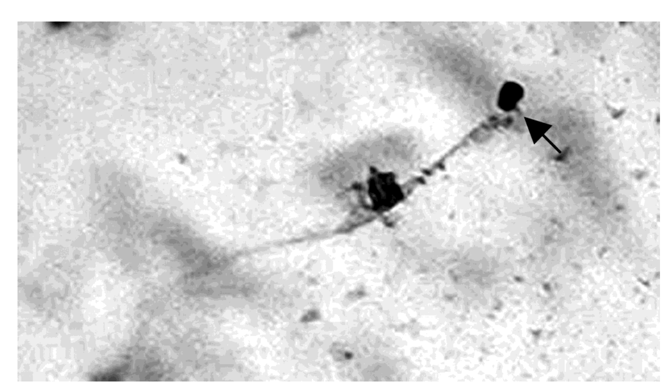


Figure 6. - Anomalie de la pièce intermédiaire du spermatozoïde : volumineuse chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the intermediate piece of spermatozoa: voluminous. Papanicolaou staining.]*

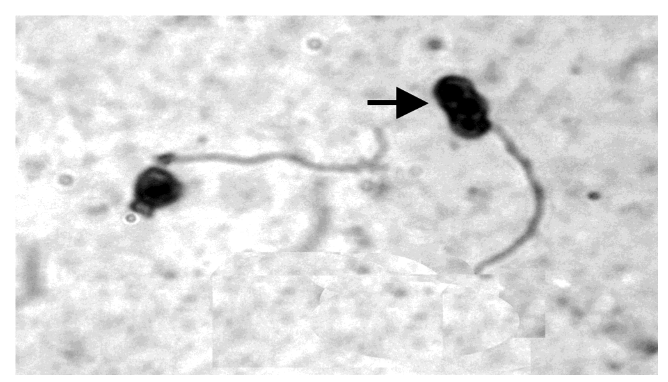


Figure 7. - Anomalie de la tête du spermatozoïde : irrégulière chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the head of spermatozoa: irregular. Papanicolaou staining.]*



Figure 8. - Anomalie de la tête du spermatozoïde : microcéphalie chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the head of spermatozoa: microcephalic. Papanicolaou staining.]*

En phase d'émission, la décroissance de la mobilité est observée après 15 min, elle devient de plus en plus faible et s'arrête à partir de 60 min (Fig. 2). La durée totale de mobilité des spermatozoïdes est plus courte au début et à la fin de la période de frai, 48 min en avril et 35 min en août.

L'observation microscopique du sperme permet de distinguer les spermatozoïdes (Fig. 3) et révèle aussi un aspect d'agglutination spontanée malgré la liquéfaction du sperme (Fig. 4). Les gamètes se présentent sous forme d'amas agglutinés en regroupement des têtes des spermatozoïdes.

La technique de coloration Papanicolaou nous a permis

de différencier sur les 600 observations, 32% de spermatozoïdes présentant des aspects morphologiques atypiques observés essentiellement à la fin de la période de spermiation et répartis en trois catégories :

- 3% anomalies de la pièce intermédiaire dont 2% non visibles (Fig. 5) et 1% volumineuses (Fig. 6).

- 18% anomalies de la tête dont 8% irrégulières (Fig. 7), 6% microcéphalies (Fig. 8) et 4% macrocéphalies (Fig. 9).

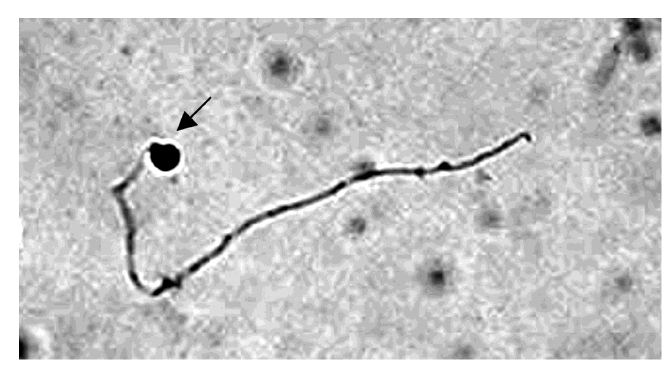


Figure 9. - Anomalie de la tête du spermatozoïde : macrocéphalie chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the head of spermatozoa: macrocephalic. Papanicolaou staining.]*

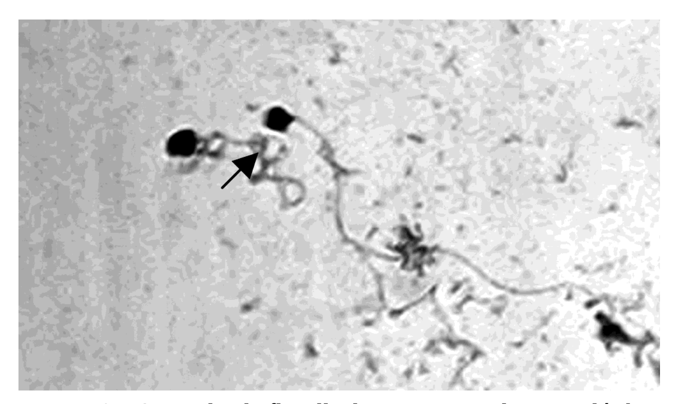


Figure 10. - Anomalie du flagelle du spermatozoïde : enroulé chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the flagellum of spermatozoa: rolled up. Papanicolaou staining.]*

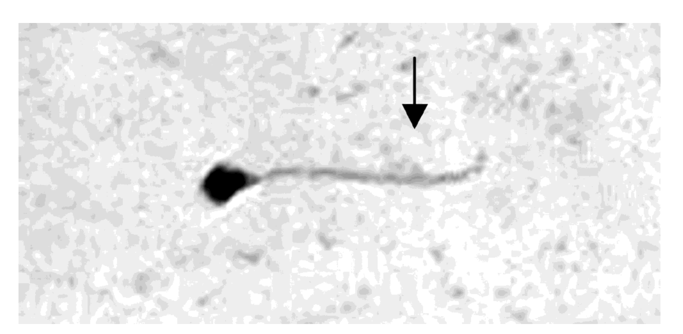


Figure 11. - Anomalie du flagelle du spermatozoïde : court chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the flagellum of spermatozoa: court . Papanicolaou staining.]*

- 11% anomalies du flagelle dont 5% flagelles enroulés (Fig. 10), 3% flagelles courts (Fig. 11), 2% angulosités du flagelle (Fig. 12) et 1% biflagellés (Fig. 13).

DISCUSSION

La concentration du sperme en gamètes est importante et varie d'une espèce à une autre. Chez *Pagellus erythrinus*, on a relevé une moyenne maximale de 36,12.10^9/ml au cours de la spermiation, elle est de 6,8.10^9/ml chez *Coregonus lavaretus*, 37,5.10^9/ml chez *Lota lota*, 76,2.10^9/ml chez *Perca fluviatilis* (Piironen et Hyvarinen, 1983) et 38,3.10^9/ml chez *Scophthalmus maximus* (Suquet *et al.*, 1992). La densité des spermatozoïdes chez *Pagellus erythrinus*, diminue au cours de la saison de spermiation. Une évolution similaire est démontrée chez *Salmo gairdneri* (Buyukhatipoglu et Holtz, 1984) tandis que chez *Salmo salar*, la tendance est inverse (Piironen, 1985). Les faibles concentrations de gamètes, mesurées au début de la saison, sont également signalées par Piironen et Hyvarinen (1983).

En général, la mobilité des spermatozoïdes est limitée à quelques minutes chez les espèces d'eau douce (Billard, 1978), mais elle est plus longue chez les poissons marins et atteint plusieurs jours chez le hareng (Yanagimachi, 1953). Celle du pageot *Pagellus erythrinus* a été établie au cours de

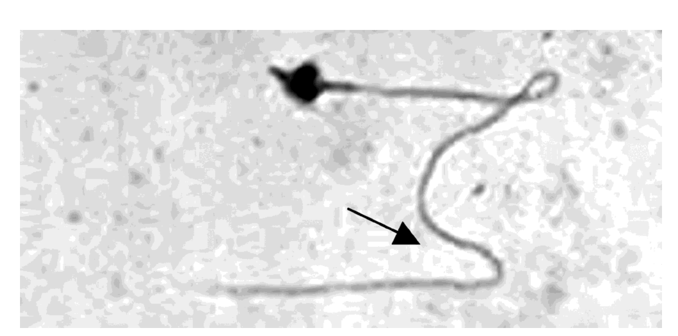


Figure 12. - Anomalie du flagelle du spermatozoïde : angulé chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the flagellum of spermatozoa: angulated . Papanicolaou colouring.]*

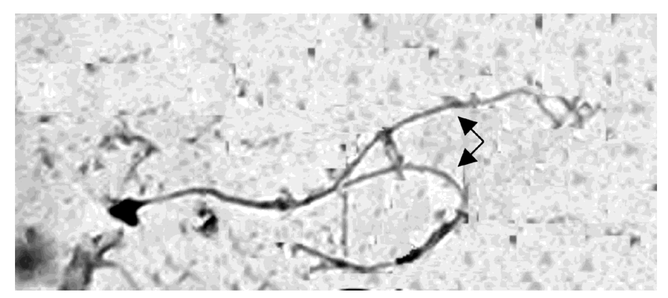


Figure 13. - Anomalie du flagelle du spermatozoïde : biflagellé chez *Pagellus erythrinus*. Coloration Papanicolaou (x1000). *[Abnormality of the flagellum of spermatozoa: biflagellate. Papanicolaou staining.]*

notre étude à 60 min. Les spermatozoïdes du chabot d'eau douce *Cottus gobis*, qui ne survivent qu'une minute dans l'eau douce, nagent durant 2 h dans une solution saline (Lahnsteiner *et al*., 1997).

La mobilité des spermatozoïdes de la perche et de la perchaude ne dure qu'une minute au maximum (Dabrowski *et al*., 1996). Chez la carpe commune, après l'éjaculation, le flagelle est désorganisé et la nage cesse au bout de 30 s (Billard *et al*., 1995). La survie des spermatozoïdes est plus longue chez les esturgeons, les lamproies (Kobayashi, 1993) et la myxine *Eptatretus burgeri*. Chez cette dernière, ils peuvent nager durant 10 min en eau de mer (Morisawa, 1995).

La période de prélèvement est déterminante pour l'aptitude des gamètes à fertiliser les œufs (Piironen et Hyvarinen, 1983 ; Methven et Crim, 1991). Chez les mâles de *Dicentrarchus labrax* en élevage, la qualité du produit sexuel diminue au cours de la période de reproduction, en particulier la mobilité et l'aptitude à la conservation et à la congélation (Billard *et al*., 1977). Chez *Pagellus erythrinus*, on a noté, lors de cette étude, que la mobilité spermique, faible au début, croît pour devenir maximale au milieu de la spermiation puis, décroît au cours de la période de reproduction rendant l'intensité initiale de mobilité des spermatozoïdes relativement faible à la fin de la saison de spermiation comme chez la truite, *Salmo gairdneri* (Munkittrick et Moccia, 1987). Ce phénomène se manifeste généralement par une diminution du pouvoir fécondant du sperme (Chemayel, 1975). Il y aurait donc un vieillissement de ce dernier, avec apparition, en fin de période de reproduction, de quelques spermatozoïdes présentant des anomalies morphologiques. Ces formes atypiques des spermatozoïdes peuvent être aussi causées par des pathologies ou des influences de l'environnement comme la pollution (Mellinger, 2002).

Tous les spermatozoïdes sont formés avant que ne débute la spermiation et ne seront éliminés du testicule que très progressivement au cours de la période de reproduction. Les derniers spermatozoïdes recueillis sont ainsi plus âgés que ceux qui sont collectés en début de saison et leur qualité apparaît alors fortement amoindrie (Billard, 1984). Les phénomènes de vieillissement du sperme ont été identifiés fréquemment chez les mammifères (Mann, 1964) mais peu d'informations existent en ce qui concerne les vertébrés inférieurs.

RÉFÉRENCES

BILLARD R., 1978. - Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. Actes Colloques CNEXO, Paris, 8: 59-73.

BILLARD R., 1984. - La conservation des gamètes et l'insémination artificielle chez le bar et la daurade. *In*: L'Aquaculture du Bar et des Sparidés (Barnabé G. & R. Billard, eds), pp. 95-116. Paris: INRA Publications.

BILLARD R., DUPONT J. & G. BARNABÉ, 1977. - Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L. (poisson, téléostéen) pendant la période de spermiation. *Aquaculture*, 11: 363-367.

BILLARD R., COSSON J., PERCHEC G. & O. LINHART, 1995. - Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.

BUYUKHATIPOGLU B. & W. HOLTZ, 1984. - Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 37: 63-71.

CHEMAYEL M., 1975. - Étude de la variabilité du pouvoir fécondant du sperme en relation avec ses caractéristiques chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* Richardson). Thèse de 3e cycle, 52 p. Univ. Paris VI.

CHEVREAU J., BELLOT J. & M.J. CABANIER, 1977. - Formulaire de Techniques histologiques. 326 p. Paris: Maloine S.A.

DABROWSKI K., CIERESZKO R.E., CIERESZKO A., TOTH G.P., CHRIST S.A., EL SAIDY D. & J.S. OTTOBRE, 1996. - Reproductive physiology of yellow perch (*Perca flavescens*) : environmental and endocronological cues. *J. Appl. Ichthyol*., 12: 139-148.

KOBAYASHI W., 1993. - Effects of osmolarity on the motility of sperm from the lamprey, *Lampetra japonica. Zool. Sci.*, 10: 281-285.

LAHNSTEINER F., BERGER B., WEISMANN T., & R.A. PATZNER, 1997. - Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio. J. Fish Biol*., 50: 564-574.

LECHEKHAB S., 2006. - Reproduction, développement et processus de différentiation des gonades hermaphrodites chez des poisons Téléostéens du golfe d'Annaba. Thèse de Doctorat, 180 p. Univ. d'Annaba, Algérie,

MANN T., 1964. - Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. 237 p. London: Methuen.

MELLINGER J., 2002. - Sexualité et Reproduction des Poissons. 349 p. Paris: CNRS Éditions.

METHVEN D.A. & L.W. CRIM, 1991. - Seasonal changes in spermatocrit, plasma sex steroids and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *In* : Proceedings of the 4th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish (Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E. & M.S. Rolfe, eds), 338 p. Norwich, UK: Univ. Eastern Anglia.

MORISAWA S., 1995. - Fine structure of spermatozoa of the hagfish *Eptatretus burgeri* (Agnatha). *Biol. Bull*., 189: 6-12.

MUNKITTRICK K.R. & R.D. MOCCIA, 1987. - Seasonal changes in that quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: Effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture*, 46: 147-156.

PIIRONEN J., 1985. - Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* M. Sebago Girard) during a spawning season. *Aquaculture*, 48: 337-350.

PIIRONEN J. & H. HYVARINEN, 1983. - Composition of the milt of some teleost fishes. *J. Fish Biol*., 22: 351-361.

STOCKLEY P., GAGE M.J.G., PARKER G.A. & A.P. MOLLER, 1996. - Female reproductive biology and the convolution of ejaculate characteristics in fish. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 263: 451-458.

SUQUET M., BILLARD R., COSSON J., DORANGE G., CHAUVAUD L., MUGNIER C. & C. FAUVEL, 1994. - Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): A comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquat. Living Resour*., 7: 283-294.

SUQUET M., OMNES M.H., NORMANT Y. & C. FAUNEL, 1992. - Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 101: 177-185.

YANAGIMACHI R., 1953. - Effects of environmental salt concentration on fertilizability of herring gametes. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ*., 11: 481-486.